

Erika Sopanen

# TEKNISET RATKAISUT ISÄNTÄSOLUN GENEETTISEEN ERISTÄMISEEN

Kandidaatintyö  
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta  
Tarkastaja: Suvi Santala  
Helmikuu 2020

# TIIVISTELMÄ

Erika Sopanen: Tekniset ratkaisut isäntäsolun geneettiseen eristämiseen  
Kandidaatintyö  
Tampereen yliopisto  
Tekniikan ja luonnontieteiden TkK-tutkinto-ohjelma, Biotekniikka  
Helmikuu 2020

---

Synteettisen biologian yleistyessä ja geneettisesti muokattujen organismien käytön lisääntyessä huolta on esitetty siitä, millaisia vaikutuksia geneettisesti muokatuilla organismeilla voisi olla niiden päästessä luontoon. Kysymyksiä on esitetty siitä, voisivatko geneettisesti muokatut organismit syrjäyttää luonnon lajeja tai geneettistä materiaalia levitä niistä luonnonkantoihin. Muokattulla geneettisellä materiaalilla voi olla odottamattomia seurauksia luonnonkannoissa, kuten toksisia metaboliatuotteita ja uusien tai vaikeammin tapettavien patogeenien syntymistä. Tämä työn tarkoituksena oli tehdä kirjallisuuskatsaus olemassa olevista menetelmistä, joiden avulla pyritään lisäämään geneettisesti muokattujen organismien käytön turvallisuutta ja joilla voidaan rajata niiden selviäminen vain tarkoitettuun ympäristöön.

Synteettisen biologian alan kehitys on vauhdittanut tutkimusta teknisistä ratkaisuista isäntäsolun geneettiseen eristämiseen. Erilaisia menetelmiä on onnistuttu kehittämään eri isäntäorganismeille. Kasvi- ja virusisäntiin on kehitetty geneettisen eristämisen menetelmiä, jotka perustuvat replikaation estämiseen. Kasviteollisuudessa on kehitetty GURT- nimellä kulkevia menetelmiä, jotka rajoittavat geneettisesti muokattujen kasvien tahatonta leviämistä luontoon. Virusisännille replikaation estämiseksi on kehitetty menetelmä nimeltä geneettinen erottaminen. Kasvi- ja virusisännille kehitetyt menetelmät ovat tehokkaita, mutta eivät sovellu mikrobi-isännissä käytettäväksi.

Mikrobi-isännille on kehitetty useita eri menetelmiä geneettiseen eristämiseen. Auksotrofia on yksi vanhimmista ja käytetyimmistä menetelmistä. Se on edullinen ja yksikertainen menetelmä, mutta sen ongelmana on menetelmän inhiboiva vaikutus solulle ja geneettisen materiaalin siirtyminen muihin kantoihin. Myös tuotetun kuolevuuden mekanismeja ja biologisia tappokatkaisimia on onnistuttu kehittämään. Ne ovat tehokkaita tappamaan isäntäsolun ja lisäksi niissä geneettinen materiaali on sellaisessa muodossa, ettei sen integroituminen luonnonkantoihin ole kannattavaa. Tappokatkaisimien mekanismit ovat kuitenkin alttiita hajoamaan DNA- poistojen ja transposonien vaikutuksesta. Xenobiologia mahdollistaa geneettisen muurin luomisen muokattujen ja luonnon kantojen välille. Se vaatii kuitenkin paljon muokkausta solulle eikä ole toistaiseksi skaalattavissa.

Yhtä mekanismeja hyödyntävät geneettisen eristämisen ratkaisut sisältävät kaikki joitakin heikkouksia. Monitasoiset ja erilaisia ratkaisuja yhdistävät ratkaisut tekevät synteettisen biologian systeemistä turvallisemman ja turvamekanismista tehokkaamman. GeneGuard on *E.coli*- isännille kehitetty erilaisia bioturvallisuuden menetelmiä yhdistelevä monitasoinen geneettisen eristämisen tekninen ratkaisu, mutta soveltuu toistaiseksi vain *E.coli*a isäntäsoluna käytettäviin sovelluksiin.

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	1
2. SYNTEETTINEN BIOLOGIA JA GENEETTISESTI MUOKATUT ORGANISMIT ...	3
2.1 Geneettisesti muokattujen organismien käyttöön liittyviä riskejä .....	4
2.2 Edellytyksiä tehokkaalle geneettiselle eristämiselle .....	5
3. GENEETTISEN ERISTÄMISEN MENETELMIÄ .....	7
3.1 Replikaation estäminen .....	7
3.2 Auksotrofia .....	9
3.3 Biologinen tappokatkaisin ja ohjattu kuolema .....	12
3.4 Xenobiologia .....	15
3.5 Monitasoinen systeemi: GeneGuard .....	17
4. JOHTOPÄÄTÖKSET .....	18
LÄHTEET .....	21

# 1. JOHDANTO

Synteettisen biologian tavoitteena on suunnitella, muokata ja rakentaa biologisia organismeja, joilla on jokin uusi tai paranneltu funktio (Serrano 2007). Synteettinen biologia pyrkii luomaan kestäviä bioteknisiä ratkaisuja mm. terveyden, energiantuotannon ja ympäristön aloille. Synteettisen biologian alan kasvaessa muokattujen organismien käytön odotetaan lisääntyvän. (Gronvall 2018)

Käytön lisääntyessä on herännyt huolta muokattujen organismien vahingollisesta leviämisestä luontoon ja niiden turvallisuudesta. Antibioottiresistenssigeeni on synteettisen biologian muokkauksessa paljon käytetty selektiomarkkeri, ja se lisätään usein muokkauksessa käytettävään vektoriin. Antibioottiresistenssigeenin sisältävien plasmidien integroituminen luonnonkantojen genomiin on hyvinkin todennäköistä, koska se voi tuoda organismille evoluutionäärin edun. Antibioottiresistenssi lisää patogeenien vastuskykyä lääkkeitä vastaan ja tuloksena voi olla hyvin vaikeasti tapettavia patogeeneja. (Lee et al. 2018) Huolta aiheuttavat myös muokatun geneettisen materiaalin aiheuttamat odottamattomat muutokset luonnonkannoissa. Geneettisesti muokatuista organismeista peräisin oleva geneettinen materiaali voi mahdollisesti myös johtaa esimerkiksi toksisten metaboliatuotteiden tai uusien patogeenien syntymiseen. (Prakash et al. 2011)

Synteettisen biologian alan kasvaessa muokattujen isäntäsolujen turvallisuuteen on kiinnitetty huomiota, ja niiden turvallista käyttöä pyritään parantamaan kehittämällä uudenlaisia muokkaustapoja. Geneettisen eristämisen teknisillä ratkaisuilla tarkoitetaan ratkaisuja, joilla pyritään estämään muokattujen organismien selviäminen, mikäli niitä pääsee ei-toivottuun ympäristöön. (Whitford et al. 2018) Horisontaalisen geenisiirron myötä myös organismin kuoleman jälkeen jokin toinen organismi pystyy vastaanottamaan sen geenejä. Tämän vuoksi geneettisen eristämisen ratkaisuissa on pyritty luomaan ratkaisuja, joilla muokatusta geneettisestä materiaalista tehdään sellaista, että luonnonkannat eivät pysty integroimaan sitä osaksi omaa genomiaan. (Haynes 2016)

Tässä työssä tarkastellaan erilaisia isäntäsolun geneettisen eristämisen menetelmiä. Tavoitteena on tehdä kirjallisuuskatsaus olemassa olevista teknisistä ratkaisuista, joilla voidaan lisätä geneettisesti muokattujen organismien käytön turvallisuutta ja estää niiden leviäminen ympäristöihin, joihin niitä ei ole suunniteltu. Luvussa 2 käydään läpi geneettisesti muokattujen organismien käyttöön liittyviä riskejä ja esitellään erilaisia menetelmiä

biologisen turvallisuuden lisäämiseksi muokattujen organismien käytössä. Luku 3 kuvaa erilaisia teknisiä ratkaisuja isäntäsolun geneettiseen eristämiseen ja menetelmien etuja ja heikkouksia. Luvussa 4 kootaan yhteen eri menetelmien hyvät ja huonot puolet, tuodaan yhteen koko työ ja pohditaan tulevaisuudennäkymiä synteettisen biologian tulevaisuudesta turvallisuuden näkökulmasta.

## 2. SYNTEETTINEN BIOLOGIA JA GENEETTISESTI MUOKATUT ORGANISMIT

Syntheettisen biologian tarkoituksena on suunnitella, muokata ja rakentaa organismeja ja biologisia systeemejä, joilla on jokin uusi tai paranneltu funktio. Uusia ja paranneltuja funktioita voidaan hyödyntää uusissa käyttökohteissa. (Serrano 2007) Syntheettinen biologia on poikkitieteellinen ala, joka yhdistää biologeja, matemaatikkoja, fyysikoita sekä insinöörejä. Sen tavoitteena on valjastaa biologian tuomat mahdollisuudet tieteellisiin ja teknisiin ratkaisuihin, joilla voidaan ratkaista ihmiskunnan ongelmia sekä haasteita. Biologisten systeemien ja organismien ymmärtäminen myös on yksi syntheettisen biologian tavoitteista. (Anderson et al. 2012)

Syntheettinen biologia on insinööritaitojen tuomista biologisiin systeemeihin. Muokkausta voidaan tehdä biologisten rakenteiden monilla eri tasoilla aina yksittäisestä molekyylistä kokonaiseen soluun, kudokseen tai organismiin. Syntheettinen biologia mahdollistaa biologisten systeemien rationaalisen ja systemaattisen suunnittelun. Ideaalitilanteessa syntheettisessä biologiassa pystytään kehittämään standardisoituja biologisia osia, kuten geenejä tai proteiineja, joita voidaan yhdistellä riippuen käyttökohteesta. Standardisoitujen biologisten osasten kehityksessä käytetään apuna bioinformatiikkaa sekä simulointia. Standardisoidut osaset olisivat sellaisia, että niiden ominaisuudet ovat tiedossa. Käyttäen apuna mallintamista olisi suhteellisen helppoa koota sellainen biologinen systemi, jolla on jokin täysin uusi funktio. (Serrano 2007)

Biologiset organismit ovat monimutkaisia, erityisesti eukaryootit verrattuna prokaryootteihin. Suuri osa syntheettisen biologian kehityksestä ja tutkimuksesta käyttää mikrobeja isäntäsoluina, koska ne ovat esimerkiksi monisoluisiin organismeihin verrattuna paljon helpompia ymmärtää ja muokata (Wright et al. 2013). Syntheettinen biologia tarjoaa bioteknisiä ratkaisuja kliiniseen käyttöön sekä teollisuuden ja ympäristöbiotekniikan aloille (Lee et al. 2018). Muokattuja organismeja käytetään esimerkiksi jätteiden käsittelyssä, lääkekehityksessä, biopolttoaineiden tuottamisessa sekä uusiutuvien kemikaalien tuottamisessa (Anderson et al. 2012; Moe-Behrens et al. 2013). Teknisten sovellusten lisäksi muokatut organismit ovat hyvä tutkimusväline biologisten prosessien ja lainalaisuuksien tutkimiseen (Lee et al. 2018). Syntheettisen biologian uskotaan tuovan tulevaisuudessa paljon uusia sovelluksia, tuotteita ja suurta kasvua bioteknologian alalle (Gronvall 2018).

## 2.1 Geneettisesti muokattujen organismien käyttöön liittyviä riskejä

Synteettisen biologian kehittyessä huolta on herännyt synteettisten mikrobien huonoista vaikutuksista niiden päästessä luontoon. Geneettisesti muokattujen organismien suunnittelun ja käytön lisääntyessä niiden vaikutuksen ekosysteemeihin sekä ihmisten terveyteen odotetaan kasvavan. (Lee et al. 2018) Avointen systeemien käyttökohteiden odotetaan lisääntyvän tulevaisuudessa, ja samalla huoli muokattujen organismien leviämisestä luontoon kasvaa (Moe-Behrens et al. 2013). Kysymyksiä on esitetty siitä, voisivatko geneettisesti muokatut mikrobit syrjäyttää luonnon alkuperäiset lajit tai geneettistä materiaa paeta isäntäsolusta ja kontaminoida luonnonlajeja (Wright et al. 2013). Huolta on esitetty siitä, että geneettisesti muokatun ja tarttuvan patogeenin käytössä tapahtuu vuoto luontoon (Gronvall 2018).

Toistaiseksi muokattujen organismien aiheuttamia biologisia vaaroja ei ole vielä raportoitu. Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että muokattujen organismien käyttö voi johtaa transgeenien siirtymiseen luonnon kantoihin. Yksi huolta aiheuttava esimerkki on antibioottiresistenssigeenin leviäminen. Antibioottiresistenssigeeni lisätään usein muokattuihin organismeihin, koska sen avulla pidetään yllä selektiopainetta populaatiossa ja se toimii selektiomerkkinä. Transgeenien leviämällä voi olla ihmisen terveyteen suora vaikutus, sillä antibioottiresistenssigeeni patogeeneissa lisää mikrobien vastustuskykyä lääkille. (Lee et al. 2018) Horisontaalisella geenisiirrolla voi myös olla vaikutuksia, jota ei osata ennustaa. Luonnonkannassa voi tapahtua odottamattomia muutoksia muokatun geneettisen materiaalin siirtyessä niihin. Nämä muutokset voivat johtaa esimerkiksi luonnolle haitallisten metaboliatuotteiden tai uusien patogeenien syntyyn. (Prakash et al. 2011)

Synteettisillä organismeilla on erilainen fysiologia kuin luonnon organismeilla. Tämä voi vaikuttaa niiden vuorovaikutukseen ympäristön kanssa. Tämä voi johtaa siihen, että synteettinen organismi tuottaa luonnon ympäristössä myrkyllisiä aineita tai muuten haitallisia metaboliitteja. Synteettiset organismit ovat kilpailukykyisiä luonnonorganismien kanssa luonnon ympäristöissä. Tarkkaa tietoa siitä, miten se vaikuttaa elinympäristöön, ruokaverkkoihin ja biodiversiteettiin. Geneettisesti muokatut organismit voivat sopeutua luonnonympäristöihin ja ne voivat mukauttaa toimintaansa sellaiseksi, että ne kykenevät säilymään ja lisääntymään karuissakin elinoloissa. (Dana et al. 2012)

Tähän asti synteettisen biologian tutkimuksesta tai tuotteiden käytöstä, jossa käytetään geneettisesti muokattuja organismeja tai DNA-rekombinantteja, ei ole raportoitu turvalli-

suusongelmia. Kuitenkaan ei voida olettaa, että kaikki synteettisen biologian tuotteet olisivat turvallisia. (Gronvall 2018) Geneettisesti muokatuista organismeista ei ole vielä täyttä varmuutta onko niiden pääsy luontoon turvallista tai vaarallista. Tiedon ollessa rajallista ei voida vielä myöskään tietää täysin, ettei odottamattomia ominaisuuksia ilmaannu biologisen systeemin kokoamisvaiheessa. (Serrano 2007) Tutkimusta ja säädösten muokkausta täytyy vielä tehdä paljon, jotta saadaan selville kaikkien käytettyjen kantojen turvallisuus ja vaarat, sillä nykyinen tieto on vielä niukkaa (Haynes 2016).

Synteettisessä biologiassa on paljon potentiaalia luoda organismeja, joilla on kustomoituja toimintoja. Näitä mahdollisuuksia täytyy käyttää turvallisesti ja vastuullisesti, etenkin kun näitä organismeja voi päästä luontoon. Tämä lisää synteettisten organismien suunnitteluun ja muokkaamiseen uusia haasteita. (Anderson et al. 2012) Moniin sovelluksiin, joissa muokattuja organismeja käytetään, liittyy riski, että näitä organismeja pääsee luontoon. Synteettisesti rakennettujen organismien käytössä tulee olla varovaisia. Ennen, kun näitä voidaan päästää suljetun ympäristön ulkopuolelle, organismien käytös täytyy olla täysin ennustettavissa. (Anderson et al. 2012)

## **2.2 Edellytyksiä tehokkaalle geneettiselle eristämiselle**

Bioturvallisuudella tarkoitetaan tartuntaa aiheuttavien tai vaarallisten mikro-organismien tai biologisten materiaalien turvallista käsittelyä ja hallintaa. (Gronvall 2018) Sillä tarkoitetaan kaikkia toimia, jolla estetään geneettisesti muokattujen organismien pääsyä luontoon tai vahingollista tartuttamista niillä (Whitford et al. 2018).

Geneettisellä eristämisellä tarkoitetaan teknisiä ratkaisuja, joilla pyritään estämään muokattujen organismien tahaton leviäminen luontoon. Nämä biologisen hallinnan menetelmät auttavat parantamaan muokattujen organismien käytön turvallisuutta. (Haynes 2016) Geneettisten suojausmekanismien tulee täyttää tietyt vaatimukset, jotta ne estävät geneettisesti muokattujen organismien pääsyn luontoon, niiden lisääntymisen sekä vuorovaikutuksen ekosysteemin kanssa (Lee et al. 2018).

Yksi hyvin tärkeä ominaisuus geneettisen eristämisen menetelmässä on matala mikrobien vapautumismäärä. Vähäinen vapaaksi päässeiden mikrobien määrä rajoittaa niiden kasvua ympäristössä, johon niitä ei ole tarkoitettu. (Gallagher et al. 2015) Yhdysvaltojen terveysvirasto National Institute of Health on julkaissut suosituksen geneettisesti muokattujen organismien vapautumismäärälle. Heidän mukaansa alle yksi solu  $10^8$  solussa on hyväksyttävän turvallinen määrä vapaaksi pääseviä organismeja. Olemassa olevat biologisen hallinnan systeemit täyttävät tämän vaatimuksen hyvin. Kuitenkin geneetti-



sesti muokattujen organismien käyttöönoton lisääntyessä olemassa olevien hallintasysteemien tehokkuus ei ehkä ole riittävä estämään geneettisesti muokattujen organismien lisääntymistä luonnossa. Jatkuvaa parantamista systeemien tehokkuudessa ja vakauudessa tarvitaan, jotta voidaan taata organismien käytön turvallisuus. (Lee et al. 2018)

Biologisen hallinnan menetelmän modulaarisuus mahdollistaa monitasoisen suojan, joka lisää hallintamenetelmän luotettavuutta. Lisäksi se mahdollistaa menetelmien käytön eri organismeissa, koska se lisää siirrettävyyttä. (Gallagher et al. 2015) Modulaarisuutta käytetään yleensä monimutkaisten systeemien suunnittelussa. Suuren systeemin suunnittelussa käytetään usein alhaalta ylös -tekniikkaa, jossa ongelma jaetaan monitasoisesti pienempiin alaongelmiin. Näiden ratkaisemiseen voidaan käyttää pienempiä systeemejä, jotka ovat usein jo olemassa olevia moduuleja, jotka ovat tietyn ongelman ratkaisuun. (Anderson et al. 2012)

Geneettisesti muokatut organismit ovat eläviä olioita, jotka pystyvät kasvamaan ja kahdentumaan. Tällaiseen upotetun biohallintasysteemin tulee olla erittäin voimakas, jotta se estää pientenkin määrien vapautumisen suuresta joukosta. Jo pienikin vapautunut määrä voi lisääntyä luonnossa ja alkaa dominoimaan ekosysteemissä. (Lee et al. 2018) Systeemien pysyvyys on myös yksi avainkriteeri tehokkaassa menetelmässä. Muokatut organismit ovat usein suunniteltu siten, että niiden odotetaan kahdentuvan monien sukupolvien läpi ja eri kasvun vaiheissa. Jotta voidaan säilyttää systeemin voimakkuus ja pysyvyys, geneettisen turvamekanismin suunnittelussa täytyy ottaa huomioon mahdollinen geneettisten hiljennysmekanismien, kuten mutageneesin ja rekombinaation vaikutus. (Lee et al. 2018)

Ideaali geneettinen eristysmenetelmä antaa organismin kukoistaa neutraaltilassa ja aktivoituna se tappaa koko populaation tehokkaasti. Lisäksi suojamenetelmää koodaava DNA:n tulisi olla blokattu geenisiirrolta luonnon organismeihin. Biotekniikan sovelluksissa tarvitaan yksinkertaisia, siirrettäviä bioturvasysteemejä, joita voidaan helposti muokata ja asettaa eri isäntäsoluihin. (Haynes 2016) Innovatiivisilla hallintamekanismeilla voidaan parantaa muokattujen organismien käytön turvallisuutta avoimissa systeemeissä. Lisäksi niillä voidaan estää karanneiden mikrobien lisääntyminen ja estää geneettisen materiaalin leviäminen isäntäsoluihin, joihin niitä ei ole tarkoitettu. (Moe-Behrens et al. 2013)

### 3. GENEETTISEN ERISTÄMISEN MENETELMIÄ

Suljetussa tuotannon ympäristössä muokattujen organismien hallinta on yksinkertaista. Fyysinen hallinta on helppoa ja jätteiden käsittelyn tehokkuutta pystytään helposti seuraamaan. Fyysinen hallinta perustuu organismien käyttöön suljetussa ympäristössä. Tällainen voi esimerkiksi olla bioreaktori. Suljetun ympäristön käytössä on kuitenkin olemassa riski, että muokattuja organismeja pääsee ympäristöön, johon niitä ei ole tarkoitettu. (Moe-Behrens et al. 2013) Mikäli muokattujen organismien käyttö leviää avoimeen systeemiin, ei pelkkä fyysinen hallinta enää riitä (Haynes 2016).

Biologisen hallinnan menetelmillä pyritään lisäämään muokattujen organismien käytön turvallisuutta. Avointen systeemien, kuten biopuhdistuksen sekä maanviljelyn ja lääketieteen käyttökohteissa käytetty mikrobipopulaatio leviää suuremmalle alalle odottamattomammin, joten organismien sisäisiä biologisen hallinnan menetelmiä tarvitaan. GMO-kasvatuksien huolellinen hävittäminen on normaalikäytäntö teollisuudessa ja tutkimuslaboratorioissa (Haynes 2016). Kuitenkin aina, kun työhön osallistuu ihmisiä, on mahdollista sattua virheitä ja näin muokattuja organismeja voi päästä luontoon. (Gronvall 2018) Lisäksi myös suljetuissa systeemeissä on riski organismien pääsyyn tarkoitetun ympäristön ulkopuolelle, joten muokattuun organismiin itseensä rakennettu hallintamenetelmä paljon luotettavampi kuin pelkkä fyysinen hallinta. (Moe-Behrens et al. 2013) Lisääntyneen käytön myötä monia pyrkimyksiä on tehty näiden organismien ja transgeenisen materiaalin eristämiseksi. (Lee et al. 2018)

#### 3.1 Replikaation estäminen

Yksi vanhimmista biologisen hallinnan menetelmistä on replikaation estäminen geneettisesti muokatuissa organismeissa. Muokattujen kasvien tahattoman leviämisen estämiseksi 1990-luvulla kehitettiin menetelmä nimeltään GURT (Genetic Use Restriction Technology). Tässä muokatuilta kasveilta poistetaan kyky lisääntyä. Siemeniä kehittävää geeniä kontrolloidaan kasvissa kemiallisella promoottorilla. Ympäristö, jossa tätä promoottoria ei ole saatavilla, johtaa lisääntymiskyvyttömän kasvin muodostumiseen. Tämä estää kasvin leviämisen. (Lee et al. 2018) Vuosien saatossa on kehitetty useita erilaisia GURT-menetelmiä. Nimellä GURT viitataan yleisesti menetelmiin, jotka tarjoavat spesifisiä geneettisiä kytkinmekanismeja, joilla rajoitetaan luvaton geneettisen materiaalin käyttöä hankaloittamalla lisääntymistä tai geenin ekspressiota geneettisesti muokatussa kasvissa. Ne kehitettiin alun perin suojelemaan maanviljelyssä kasvilajeja,

mutta samanaikaisesti ne rajoittavat geneettisesti muokattujen kasvien tahatonta leviämistä. (Lombardo 2014)

GURT- menetelmillä pyritään kontrolloimaan kasvin kykyä lisääntyä ja tuottaa siemeniä siten, että kontrolloidaan näitä ohjaavia geneettisiä prosesseja kemiallisella indusaattorilla. Menetelmässä kasvi pystyy kasvamaan ja tuottamaan siemeniä, mutta siementen tuma kehittää toksiiinia, joka estää niiden itämisen, mikäli ne istutetaan tai ne pääsevät leviämään luonnossa. Menetelmässä siis toisen sukupolven siemenet ovat steriilejä ja siten geenimuokattujen kasvien leviäminen voidaan estää. (Lombardo 2014) GURT- menetelmät voidaan jakaa menetelmiin, jotka haittaavat transgeenien siirtymistä ja menetelmiin, jotka säätelevät tietyn ominaisuuden ilmenemistä solussa Geenien siirtyminen kasveissa tapahtuu yleensä siitepölyn tai siementen välityksellä. Siemenellä on yleensä potentiaalia päästä pidemmälle ja säilyä elinkelpoisena pidempään. GURT- menetelmät, jotka rajoittavat siementen ja taimien elinkelpoisuutta rajoittavat kasvin kykyä ilmentää geeniä, joka antaa siemenen itää ja kasvaa. (Hills et al. 2007)

Yksi vanhimmista GURT- patenteista perustuu kolmen komponentin systeemiin, joka kontrolloi geenien ilmentymistä kasvissa ja sen seurauksena kasvi tuottaa steriilin siemenen. Ensimmäinen näistä kolmesta komponentista on geeni, jonka ilmeneminen johtaa toksiiinin tuottamiseen tai erilaisen kasvin fenotyypin syntymiseen. Geeni on liitetty promoottoriin, joka aktivoituu myöhäisessä alkionkehityksessä tai siemenen kehityksessä. Geeni ja promoottori erotetaan blokkavalla sekvenssillä, jonka molemmiin puoliin on poistettavat sekvenssit. Toinen komponentti on geeni, joka koodaa poistettavalle sekvenssille spesifistä sekvenssiä. Tämä geeni on repressoituvalla promoottorilla varustettu. Kolmas ja viimeinen komponentti on geeni, joka koodaa tätä repressorin. Menetelmä toimii siten, että toisen komponentin geeni aktivoidaan kemiallisella stimulantilla, joka sitoutuu repressorin. Tämä tuottaa rekombinaasia, joka leikkaa poistettavat sekvenssit ensimmäisestä komponentista, ja tämä aktivoi toksisen geenin myöhäisessä alkionkehityksessä. Tuloksena on siemen, joka on steriili. Kaikki teknologiat, jotka perustuvat indusoitavaan tai repressoitavaan systeemiin sisältävät riskejä. Tehoton indusointi tai geenien ilmeneminen indusaattorin poissaollessa rajoittavat systeemin tehokkuutta. Yleensä GURT-systeemien tarvitsemat indusaattorit tai repressorin tarvitsemat kemikaalit ruiskutetaan kasveihin. Tätä on kyseenalaistettu, koska kemikaalit ovat yleensä antibiootteja tai hormoneja. (Hills et al. 2007)

Toinen menetelmä replikaation estämiseen on geneettinen erottaminen, jota käytetään paljon virusten muokkaamisessa. Menetelmä kehitettiin estämään muokatun lentiviruksen tahaton replikaatio. (Lee et al. 2018) Lentiviruksen johdokset ovat geenisiirrossa pal-

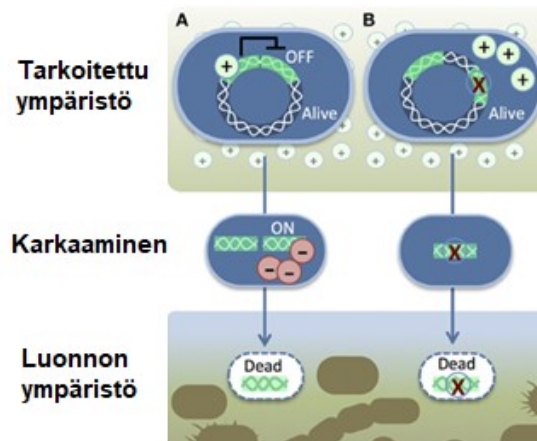
jon käytettyjä vektoreita, sillä ne ovat tehokkaita vektoreita. Patogeenisista viruksista johdettujen vektorien käyttö aiheuttaa kuitenkin huolta niiden patogeenisyydestä. (Zufferey et al. 1998) Retroviruksista johdetut vektorit ovat houkuttavia geeniterapiassa, koska ne integroituvat kohteen kromosomiin, joka usein vaaditaan pitkäaikaiseen geeniekspression saavuttamiseksi. Näillä on suuri kloonauksen kapasiteetti, joka sopii hyvin suunniteltuihin kliinisiin käyttötarkoituksiin. Näiden ominaisuuksien ansiosta transgeenejä saadaan tehokkaasti kuljetettua ja integroitua soluun sekä ilmenettyä. (Zufferey et al. 1998)

Bioturvallisen virusvektorin suunnittelussa pyritään estämään replikaatioon kykenevien rekombinanttien syntyminen. (Zufferey et al. 1998) Virusvektorit perustuvat siihen, että niistä tehdään kaksiosaisia. Viruksen osasynteesiin osallistuvat tärkeät geenit jaetaan useaan eri vektoriin ja transgeenit sijoitetaan osiin, jotka eivät kykene yksinään replikaatioon. (Lee et al. 2018) Toisessa osassa on pakkauselementit, jotka kattavat rakenteelliset proteiinit ja tarvittavat entsyymit. Toinen osa, itse vektori, sisältää geneettisen materiaalin, joka halutaan siirtää kohdesoluun. Pakkausyksikkö muokataan siten, että siihen jätetään vain kolme yhdeksästä HIV-1 viruksen genomien geenistä, *gag*, *pol* ja *rev*. Näin poistetaan mahdollisuus, että rekombinaation kautta villintyyppin virus voisi rakentua. Vielä tehokkaammassa systeemissä transkriptioon osallistuvat elementit poistetaan vektorista. Näin pysytään luomaan itse-inaktivoivia vektoreita. (Zufferey et al. 1998) Kontrolloitu replikaatio ja muokattu lisääntymiskyvyttömyys ovat tehokkaita menetelmiä kasveille ja viruksille, mutta niitä ei voi hyödyntää mikro-organismeissa, jotka kykenevät lisääntymään itsenäisesti. (Lee et al. 2018)

### 3.2 Auksotrofia

Yksi vanhimmista ja käytetyimmistä geneettisen eristämisen menetelmistä on suunnitella auksotrofi organismi. Organismista muokataan sellainen, ettei se pysty syntetisoimaan yhtä tai useampaa yhdistettä, jota se tarvitsee elääkseen tai kahdentumiseen. Tämä yhdiste tulee siis tarjota organismille ulkopuolelta. Jotta organismista saadaan auksotrofi, täytyy siitä yleensä poistaa geenejä, jotka vastaavat tärkeiden metaboliittien, kuten nukleotidien tai aminohappojen, tuottamisesta (Lee et al. 2018). Mikäli mikrobi pääsee karkaamaan kontrolloidusta ympäristöstä ja päätyy ympäristöön, jossa tarvittavaa yhdistettä ei ole saatavilla, se kuolee. (Moe-Behrens et al. 2013) Muokattua auksotrofiaa voidaan käyttää kahdella tapaa geneettisessä eristämisessä: yhdiste kontrolloidussa ympäristössä toimii joko muokatun organismin ravinteena, tai se ehkäisee mikrobien tuottamista toksineja, joka tappaa sen. Ravinne siis joko lisää mikrobien kasvua ja näin kompensoi geneettistä häviämistä tai se pitää mikrobien hengissä siten, ettei se tuota

toksiinia, jota tuottaessaan mikrobi kuolisi (Moe-Behrens et al. 2013). Auksotrofian perinteiset toteutustavat on havainnollistettu kuvassa 1.



**Kuva 1.** Auksotrofian toteutustavat: A) Yhdiste inhiboi toksisen geenin ilmentymistä. Mikrobin jouduttua tarkoitetun ympäristön ulkopuolelle toksinen geeni ilmenee soluissa ja mikrobi kuolee. B) Yhdiste toimii mikrobin ravinteena, jolloin organismi voi lisätä geneettistä materiaa. Tarkoitettun ympäristön ulkopuolella yhdistettä eli ravintoa ei ole saatavilla ja mikrobi nääntyy. Muokattu lähteestä Moe-Behrens et al. 2013.

Kun muokattu auksotrofi ei pysty syntetisoimaan sille välttämätöntä yhdistettä, jota se tarvitsee ravintonaan, se nääntyy. Ongelmana voi kuitenkin olla se, että mikrobi voi selvitä tarpeeksi pitkään ja löytää uuden ravinnonlähteen ympäristöstään. (Haynes 2016) Mikrobi voi löytää ympäristöstään tarvitsemaansa yhdistettä jonkun toisen organismin tuottamana. Muokattu organismi voi myös saada siitä poistetut geenit takaisin horisontaalisen geenisiirron avulla, jolloin hallintamenetelmän teho katoaa. (Lee et al. 2018) Muokattu auksotrofia inhiboi myös usein organismin kasvua silloinkin, kun sen kasvuille vaadittavaa metaboliittia syötetään organismille. Tämän takia muokatut auksotrofit soveltuvat huonosti käytettäväksi bioreaktoreissa ja muissa sovelluksissa, jotka vaativat tehokasta kasvua. (Simon & Ellington 2016)

Modernimpi versio muokatusta auksotrofista on tehdä organismi riippuvaiseksi synteettisestä yhdisteestä. Tämä lisää varmuutta siitä, ettei organismi pärjää suunniteltujen olosuhteiden ulkopuolella. Tällainen muokkaaminen on kuitenkin huomattavasti hankalampaa, kuin poistaa organismilta kyky tuottaa jotain luonnollista metaboliittia, sillä se vaatii tietyn toiminnon liittämisen tai metabolisen yhteyden muodostamisen synteettiseen yhdisteeseen. (Simon & Ellington 2016) Genomimuokkauksen kehityksen myötä esimerkiksi *Escherichia coli*-bakteeria on onnistuttu muokkaamaan siten, että se on riippuvainen synteettisistä aminohapoista. Kuitenkaan muut bioteknisissä ratkaisuissa käytetyt organismit, kuten biopuhdistuksessa käytetty *Pseudomonas putida*, maidon ja juuston valmistuksessa käytetty *Lactococcus lactis* ja maaperästä sekä suolistosta löytyvä bakteeri *Bacillus subtilis* eivät ole niin mukautuvia tällaiselle muokkaukselle. (Haynes 2016)

Auksotrofiaa voidaan tehdä joko satunnaisen mutaation tai kohdistetun muokkauksen kautta. Ensimmäinen käytetty auksotrofi oli vuonna 1977 kehitetty *E.coli*-kanta, joka tarvitsi diaminopimeliinihappoa ja tymiiniä tai tymidiiniä kasvaakseen. Monet nykypäivän laboratorioissa käytetyt *E.coli*-kannat ovat auksotrofimutanteja. Auksotrofiaan perustuvia systeemejä on kehitetty vuosien saatossa ja niiden avulla muokattujen organismien tahatonta leviämistä luontoon on pystytty rajoittamaan. Auksotrofiaan perustuvia systeemejä löytyy luonnostakin monia, ja ne ovat riippuvaisia erilaisista yhdisteistä, mutta useimmat aminohapoista tai vitamiineista. (Whitford et al. 2018)

Auksotrofiaa on käytetty myös korvaamaan antibioottiresistenssigeenin käyttöä plasmidissa selektiomarkkerina. Geneettisessä muokkauksessa antibioottiresistenssigeeniä käytetään usein, ja tämä koetaan vaaralliseksi, sillä se voi johtaa antibioottiresistenssin leviämiseen ympäristöön. Vaihtoehtoiseksi selektiomarkkeriksi on tutkittu auksotrofiaa. *E. coli* M15- kantaan on onnistuttu muokkaamaan inaktiivinen *glyA*-geeni, joka on välttämätön glysiinin synteesille. Kantaan lisätään plasmidi, tarjoaa *glyA*-geenin organismille. Koska organismi tarvitsee plasmidissa olevaa geeniä elääkseen, se pitää plasmidin organismissa. (Whitford et al. 2018)

Antibioottiresistenssivapaita auksotrofeja on käytetty turvametodina myös rokotteiden kehityksessä ja myös muissa kuin *E.coli* -kannoissa. Esimerkiksi rokotetta naudan brucelloosi -tautiin on tuotettu antibioottiresistenssivapaalla kannalla. Tässä käytetään mutanttia *Brucella abortus* -kantaa, jolla ei ole *leuB*-geeniä, jota tarvitaan leusiinin tuottoon. Kantaan on lisätty plasmidi, joka kantaa tätä geeniä. *B. abortus* pystyy selviämään ja plasmidi säilyy kannassa selektiivisen paineen avulla. Tuloksena on siis biologisesti turvallinen rokotteentuottosysteemi, koska kanta indusoi immuunivastetta plasmidin kautta, joka sisältää geenin halutun antigeenin tuotolle. Se ei kuitenkaan sisällä antibioottiresistenssigeeniä, joka voisi mahdollisesti levitä ympäristöön. (Whitford et al. 2018)

Auksotrofit muokatut organismit ovat yksinkertainen ja kustannustehokas bioturvallisuuden ratkaisu ja auksotrofiaa voidaan hyödyntää monissa eri sovelluksissa. Auksotrofiaa voidaan myös toteuttaa useilla eri tavoilla. Organismien tarvitsevia yhdisteitä voidaan tarjota organismille esimerkiksi kasvatusmedian kautta. Mitä useammasta yhdisteestä organismi on riippuvainen, sitä varmempi menetelmä on. Auksotrofiassa on kuitenkin joitakin ongelmia, sillä organismi voi saada tarvitsemansa ravinteen toisen organismin tuottamana ja selektiopaine heterogeenisessä ympäristössä voi hajottaa turvamekanismin. (Whitford et al. 2018) Synteettiset auksotrofit nojaavat suuriin muokkauksiin genomissa, ja tämä tekee organismeista epäkäytännöllisiä käytettäväksi teollisissa sovelluksissa ja terapeuttisissa mikrobeissa. Auksotrofit organismit on vaikeita uudelleenohjelmoida erilaisiin olosuhteisiin, mikä rajoittaa niiden potentiaalia. (Clement TY Chan et al. 2016)

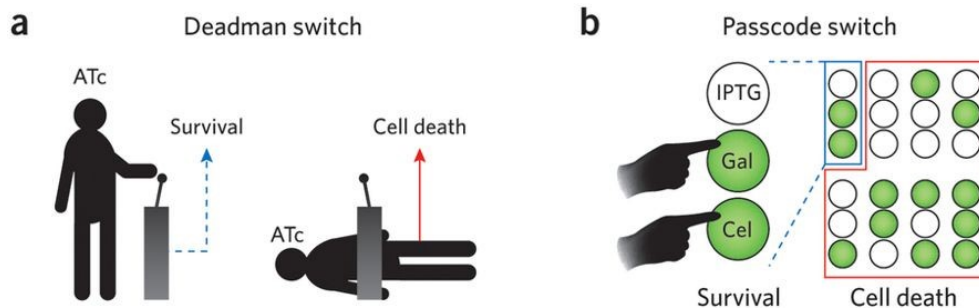
### 3.3 Biologinen tappokatkaisin ja ohjattu kuolema

Tuotetun kuolevuuden (eng. induced lethality) mekanismeja ja biologisia tappokatkaisimia (eng. kill switch) on suunniteltu geneettisiksi suojamuureiksi. Muokattu organismi selviää normaalisti, kunnes sille annetaan signaali. Tuotettua kuolevuutta voitaisiin käyttää ympäristön puhdistamiseen, jos vahingollisia mikrobipäästöjä luontoon tapahtuu. Puhdistaminen voidaan tehdä siten, ettei muita ympäristössä olevia mikrobeja vahingoiteta. (Moe-Behrens et al. 2013) Biologinen tappokatkaisin on ideaali bioturvallisuuden menetelmä, joka neutraalissa tilassa antaa mikrobin elää ja kasvaa, ja sen aktivoidessa tappaa koko populaation tehokkaasti. (Haynes 2016)

Biologinen tappokatkaisin toimii siten, että sillä aiheutetaan muokatun organismin kuolema aktivoimalla toksinen geeni. Tappava geeni aktivoituu joko siten, että ympäristöstä ei enää löydy tiettyä yhdistettä, joka inhiboi geenin ekspressiota tai niin, että mikrobille syötetään tappogeeniä indusoivaa yhdistettä. (Haynes 2016) Tappokatkaisimista on pyritty tekemään tehokkaampia ja vähentämään mutaatioiden vaikutusta niihin. Tällaiset tappokatkaisimet toimivat siten, että organismi tarvitsee tiettyä hyvin spesifistä yhdistettä vaientamaan tappogeeniä. Organismissa on tämän lisäksi geenejä, jotka vahvistavat tappogeenin toimintaa ja vaativat myös toimiakseen tiettyjä yhdisteitä. Nämä tappokatkaisimet tarvitsevat siis toimiakseen sekä tietyn yhdisteen läsnäolon, että tappogeeniä vaientaman yhdisteen poissaolon. Tämä tappokatkaisin toimii nopeammin ja on siksi stabiilimpi. (Simon & Ellington 2016) Katkaisimia, jotka vaativat tietyn yhdistelmän yhdisteiden poissaoloa ja läsnäoloa kutsutaan pääsykoodi- katkaisimiksi (eng. passcode switch). Ne käyttävät Boolean logiikkaa havaitsemaan eri yhdistelmiä yhdisteitä, jotka tarvitaan solun selviämiseen. (Haynes 2016)

Vaihtoehtoinen lähestymistapa biologiseen hallintaan on geneettisten piirien käyttö elintärkeiden geenien ilmentymisen ylläpitämisessä sekä toksisten geenien ilmentymisen estämisessä. Kun organismi ei enää saa signaalia, geneettinen piiri estää geenien ilmentymisen tai indusoi toksisen geenin ilmentymisen, jolloin solu kuolee. (Clement TY Chan et al. 2016) Yksi tällainen lähestymistapa ohjattuun kuolemaan on DNAi- systeemi, joka sisältää Cas9- proteiinin. Cas9 on proteiini, joka leikkaa DNA:sta paloja tai muuten muokkaa sen toimintaa. Piiri on muokattu toimimaan niin, että tietyn yhdisteen puuttuessa organismin ympäristöstä Cas9 vahingoittaa tiettyä osaa organismin DNA:ssa. Tämä aiheuttaa organismin kuoleman tarkoitetun ympäristön ulkopuolella. Cas9 voidaan ohjata vahingoittamaan elämälle välttämätöntä osaa DNA:ssa. (Simon & Ellington 2016) Geneettiset piirit ovat lupaavia kompleksisten ympäristösignaalien integroinnissa soluihin, mutta ohjelmoitavien sensorien puute vaikeuttaa näiden käyttöä laboratoriotilojen

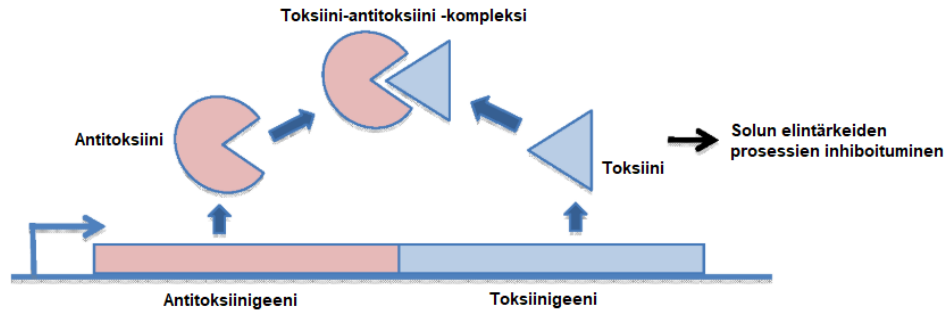
ulkopuolella. (Clement TY Chan et al. 2016) Geneettisiin piireihin perustuvia ohjatun kuoleman tappokatkaisimia kutsutaan kuolleen miehen katkaisimiksi (engl. deadman switch), sillä organismi saa toimia normaalisti niin kauan, kun operaattori on läsnä eli tarvittavaa yhdistettä tarjotaan. Mikäli operaattoria ei ole läsnä, yhdisteen saanti loppuu ja kytkin tappaa solun. (Haynes 2016) Kuolleen miehen katkaisimen ja pääsykoodi- katkaisimen toimintaa on havainnollistettu kuvassa 2.



**Kuva 2.** A) Kuolleen miehen katkaisin: operaattorin syöttäessä tarvittavaa yhdistettä organismi selviää. Kun organismille ei tarjota enää sen tarvitsemaa yhdistettä, ilmenee toksinen geeni soluissa ja ne kuolevat. B) Pääsykoodi- katkaisin: tiettyjen yhdisteiden yhdistelmän läsnä ollessa organismi selviää. Tämä pääsykoodi-katkaisin vaatii solun selviämiseksi IPTG:n poissaolon ja galaktoosin (Gal) ja sellobioosin (Cel) läsnäolon. Muilla kombinaatioilla katkaisin aktivoituu ja solu kuolee. Muokattu lähteestä Haynes 2016.

Vaikka organismi olisikin ohjelmoitu tuhoamaan itsensä, se olla ympäristöriski kuolemansa jälkeen (Wright et al. 2013). Monet prokaryootit ovat kehittäneet reittejä horisontaaliselle geenisiirrolle. Muokatuissa organismeissa se aiheuttaa riskin, että muokatut geenit siirtyvät luonnon organismeihin tai toisinpäin. (Lee et al. 2018) Etenkin silloin, kun geneettisen informaation omaksumisella on evolutionäärinen etu vastaanottajasolulle, kuten esimerkiksi antibioottiresistenssigeeni, se säilyy todennäköisemmin genomissa. Tämän takia geneettisessä eristämisessä on tärkeää pyrkiä estämään transgeenien siirtymisen. (Lee et al. 2018) Tappokatkaisimet käyttävätkin yleensä hyväkseen bakteriolyttistä toksiini-antitoksiini -systeemiä. Toksiini-aktitoksiini -systeemit ovat bakteereissa esiintyviä systeemejä ja ne koostuvat toksiinista ja aktitoksiinista. Näistä komponenteista syntyy kompleksi, jossa toksiinin aktiivisuus tai synteesi inhiboidaan antitoksiinin vaikutuksesta. Mikäli sopivaa antitoksiinia ei ilmene, toksiini inhiboi solulle elintärkeitä geenejä. (Whitford et al. 2018) Toksiini-antitoksiini -systeemin toiminta on kuvattu kuvassa 3.





**Kuva 3.** Toksiini-antitoksiini- systeemi. Toksiini- ja antitoksiinigeenien ilmentyessä solu tuottaa toksiinia ja antitoksiinia, joka sitoutuu toksiiniin. Ne muodostavat yhdessä stabiilin kompleksin, joka inhiboi toksiinin toiminnan. Mikäli antitoksiinia ei ilmennetä, toksiini inhiboi solulle elintärkeitä prosesseja. Muokattu lähteestä Hong-Geller & Micheva-Viteva 2015.

Yhdistämällä toksiini- antitoksiini -systeemin ja itsetuhoosysteemin voidaan ehkäistä rekombinantti-DNA:n leviäminen ja samalla estää organismin leviäminen ei- halutussa ympäristössä. (Whitford et al. 2018) Toksiini- antitoksiini- parisysteemin käytössä toksinen geeni on liitetty plasmidiin. Tämän plasmidin vastaanottajasolun täytyy ilmentää sopivaa antitoksiinia, joka inhiboi geenin toksisen vaikutuksen. Mikäli siis luonnon organismi vastaanottaa tällaisen geenin, eikä siinä ilmennyt sopivaa antitoksiinia, se kuolee. (Simon & Ellington 2016) Toksiini ja antitoksiini muodostavat stabiilin kompleksin, joka inhiboi toksiinia ja estää tuhoavan vaikutuksen solulle. Tämä toksiini- antitoksiini -kompleksi kiinnittyy toksiini- antitoksiini -promootorialueelle ja se tukahduttaa antitoksiinia ja toksiinia transkriptoivat geenit. Koska toksiini on stabiilimpi kuin antitoksiini, stressiolioissa toksiinin tukahduttava vaikutus voidaan ohittaa ja tämä aiheuttaa solun kasvun inhibointia ja lopulta solun kuoleman. (Whitford et al. 2018)

Esimerkki toksiini-antitoksiini-systeemin ja itsetuhoosysteemin yhdistävästä systeemistä on sellainen, jossa samalla kun solu tapetaan, sen nukleiinihapot hajotetaan. Nukleiinihappoja tuhoavat systeemit voidaan jakaa spesifisiin ja ei spesifisiin systeemeihin. Spesifiset systeemit perustuvat nukleaaseihin, jotka hydrolysoivat nukleiinihappoja restriktioentsyymien tunnistuskohdissa. Ei- spesifiset systeemit käyttävät nukleaaseja hydrolysoimaan DNA:ta ja ne eivät ole sekvenssispesifisiä (Whitford et al. 2018) Systeemeissä nukleaasi on toksiini, joka koodataan plasmidissa. Antitoksiini on nukleaasi-metyylitransferaasi ja se koodataan kromosomissa. Spesifisessä systeemissä ne kohdistuvat sekvenssispesifiseen osaan DNA:n tunnistuskohdassa. Systeemeissä toksiinin tuotto on konstitutiivisesti ilmentyvä ja antitoksiinin tuotto on promootorilla indusoitua. Kun antitoksiinia ilmennetään, se metyloi nukleiiniemäksi tunnistuskohdissa. Tällöin nukleaasi ei voi luoda metyloituun kohtaan DNA:ta aukkoja. Systeemi on horisontaalisen geenisiirron suhteen turvallinen, sillä plasmidin vastaanottavalla organismilla ei todennäköisesti

ole sopivaa antitoksiinia, joten se ei pysty vastustamaan nukleaaasin toimintaa. (Whitford et al. 2018)

Vaikka tappokatkaisimet ovatkin usein hyvin tehokkaita, ovat niitä kantavat organismit alttiita transposonien esiintymiselle, jotka voivat häiritä toksisuutta ilmaisevaa geeniä ja rikkoa tappokatkaisimen aiheuttaessaan mutaation. (Simon & Ellington 2016; Haynes 2016) Myös DNA poistot voivat aiheuttaa mekanismin rikkoutumisen. Ideaali katkaisin on resistentti vahingoille. (Haynes 2016)

### 3.4 Xenobiologia

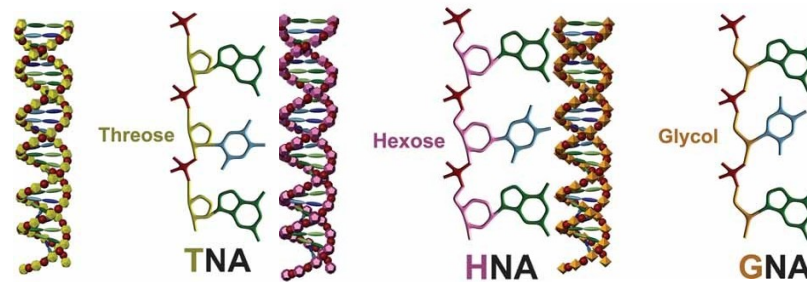
Xenobiologian pyrkimyksenä on kontrolloida geneettisen informaation siirtymistä täysin luomalla organismeja, jotka ovat täysin riippuvaisia ei-luonnollisista aminohapoista, kuten synteettisistä aminohapoista ja nukleinihappoanalogeista. (Lee et al. 2018) Näissä organismi käyttää ei-luonnollisia nukleinihappoja geneettisen informaation koodaamiseen, jotka ohjaavat funktionaalisia aktiviteetteja (Whitford et al. 2018). Nukleinihappoanalogit ovat rakenteellisesti samanlaisia kuin luonnollinen RNA tai DNA, mutta niihin on tehty muutos joko fosfaatti-, sokeri- tai emäsosaan. (Lee et al. 2018) Ei-luonnollisista DNA:n rakennusosista koottua tai huomattavasti muokattua DNA:ta kutsutaan XNA:ksi. XNA voi käyttää vaihtoehtoisia nukleotidien pariutumisia tai muokattuja sokereita tai selkärankaa. (Whitford et al. 2018)

Xenobiologiaan perustuvia auksotrofeja on onnistuttu tekemään proteiinitasolla. *E.coli*-kantaa on onnistuttu muokkaamaan siten, että se on riippuvainen nukleinihappoanalogista. Kantaa on muokattu siten, että sen tymiinisynteesi on puutteellinen, ja se pystyy korvaamaan tymiinin klorourasiililla. Nämä *E.coli*-solut selviävät klorourasiilin läsnäollessa ja pystyvät integroimaan klorourasiilin adeniinin, sytosiinin ja guaniinin lisäksi DNA:hansa. Klorourasiilin puuttuessa replikaatio ei onnistu ja solu kuolee. (Lee et al. 2018) Päälähestymistapa xenobiologiassa on nukleotidiemästen korvaaminen. Myös kuuden nukleotidin geneettisiä aakkosia on tutkittu. (Whitford et al. 2018)

XNA:n käyttö vaatii synteettisiä tai kehittyneitä proteiineja replikaatioon, transkriptioon, DNA pakkaamiseen. Xenobiologiset systeemit vaativat myös niissä käytettyjen ei-luonnollisten nukleotidien tarjoamisen systeemin ulkopuolelta. (Whitford et al. 2018) Ei-luonnollisia emäspareja voidaan replikoida muokattujen DNA polymeraasien avulla *in vivo* ja *in vitro*. Tällaisia emäspareja ei voida poistaa luonnollisten DNA korjausmenetelmien avulla. (Lee et al. 2018)

XNA molekyyleihin, jossa on deoksiriboosin tai riboosin tilalla on käytetty erilaista sokemolekyyliä, voidaan myös sisällyttää geneettistä informaatiota. Tämä informaatio on

luonnolliselle eliölle lukemattomassa muodossa. (Lee et al. 2018) Tällainen muokkaus vaatii funktionaalisen heliksin muodostumisen siten, ettei se vaikuta luonnollisten replikaatioentsyymien kautta, vaan tarvitsee muokattuja tai synteettisiä entsyymejä. (Whitford et al. 2018) Erilaisia vaihtoehtoja sokeriosaksi on tutkittu, kuten heksoosia, treoosia ja glykolia. Näiden sokeriosasten kanssa muodostuvaa XNA:ta kutsutaan TNA:ksi, HNA:ksi ja GNA:ksi. (Schmidt 2010) Näiden rakenteet on esitetty kuvassa 4.



**Kuva 4.** TNA:n, HNA:n ja GNA:n rakenteet. Muokattu lähteestä Schmidt 2010.

Xenobiologian lähestymistavat eliminoivat mahdollisuuden organismin pakenemiselle, leviämislle ja ravinnon käyttämiselle toisen organismin valmistamana. Xenobiologisten geenien siirtyminen horisontaalisen geenisiirron kautta luonnonkantoihin on mahdotonta, koska luonnolliset organismit eivät voi käyttää tällaisia geenejä. (Lee et al. 2018; Whitford et al. 2018) Xenobiologian avulla voidaan jopa poistaa kaikenlainen kommunikaatio muokattujen ja luonnon kantojen välillä. Xenobiologiset organismit eivät pysty tuottamaan itse tarvitsemiaan synteettisiä nukleotideja. Tämä on pohjimmiltaan tehokkain auksoτροφian tyyppi. XNA rakennusosasten tulisi olla vähintään kahdella synteettisellä tavalla muokattuja, jotta vältetään näiden löytymiseltä luonnon ympäristöistä. (Schmidt 2010)

Luonnollisten ja xeno-organismien tulisi käyttää erilaisia ja lajispesifisiä nukleotideja sitovia proteiineja replikaatiossa ja transkriptiossa. Tällä tapaa estetään horisontaalinen geenisiirto lajien välillä, sillä XNA tulisi olla luettamattomissa DNA replikointikalustolle ja päinvastoin. Organismeilla on tapana omaksua geenejä, joilla on niille evolutionäärinen etu. Tämä tulee XNA systeemeissä varmistaa molempiin suuntiin. Xenobiologisten organismien kommunikointi toistensa kanssa niiden omassa ekosysteemissä tulisi teoriassa olla mahdollista. Käytännössä xenobiologia luo ainoastaan geneettisen palomuurin, joka mahdollistaa vuorovaikutuksen luonnon organismien ja xenobiologisten organismien välillä. (Schmidt 2010)

Tulevaisuuden kehitys XNA- pohjaisessa replikaatiossa ja sen levittäminen *in vivo* -käyttöön voi lisätä nukleiinihappotason xenobiologisia turvallisuusratkaisuja. Xenobiologisten organismien vapautuminen luontoon on siinä mielessä turvallista, että luonnon organismit eivät kykene replikoimaan ja transkriptoimaan niistä mahdollisesti siirtyviä XNA

fragmentteja. DNA- ja RNA- polymeraasit eivät kykene tähän. Vastaten myöskään XNA-pohjaiset eliöt eivät kykene lukemaan luonnollista DNA:ta. (Whitford et al. 2018) Xenobiologia voisi luoda kokonaisen genomin laajuisen horisontaalisen geenisiirron suojan, mutta nykypäivän teknologia rajaa näitä mahdollisuuksia. Xenobiologisten systeemien luominen vaatii suuria määriä geneettistä muokkaamista ja tässä on haasteena aina muokkaamiselle suotuisien olosuhteiden löytäminen. Tämä rajoittaa skaalautumista sekä joustavuutta. (Lee et al. 2018)

### 3.5 Monitasoinen systeemi: GeneGuard

GeneGuard on jo olemassa olevia bioturvallisuuden ratkaisuja yhdistävä systeemi geneettisesti muokattujen organismien leviämisen ja horisontaalisen geenisiirron estämiselle. GeneGuard on muokattu plasmidi, joka on tehty kolmella eri mekanismilla riippuvaiseksi isäntäsolustaan. Plasmidit ovat liikkuvia geneettisiä elementtejä ja sen vuoksi ne koetaan bioturvallisuuden kannalta vaaralliseksi. Plasmidilla on kuitenkin hyviä ominaisuuksia synteettisten geenien siirtämiseen isäntäsoluun. Plasmideja on helppo koota, testata ja muovata verrattuna genomiin integroituun DNA:han. Plasmidiin asetettu synteettinen DNA ei ole luonnollisten genomisekvenssien reunustama, kuten se on genomisesti integroiduissa systeemeissä. Luonnollisten sekvenssien reunustamana oleminen altistaa synteettisen DNA:n rekombinaation muokkaamattomiin kantoihin. (Wright et al. 2015)

GeneGuardissa plasmideista on pyritty tekemään sellaisia, että ne ovat riippuvaisia niille tarkoitetusta isännästä ja luonnollisesti hyödyttömiä muille isännille. GeneGuard on plasmidi, jossa käytetään ehdollista replikaation aloituskohtaa, ja replikaation aloitusproteiini tarjotaan organismille *in trans*. Lisäksi siinä käytetään auksotrofia organismia sekä toksini-antitoksiiniparia, joka tekee plasmidin DNA:sta haitallisen luonnon kannoille. GeneGuard ei vaadi antibioottiresistenssigeeniä isäntäorganismiin. (Wright et al. 2015)

Systeemin on havaittu huomattavasti vähentävän plasmidin ei- tarkoitettua siirtymistä sekä homogeenisessä *E.coli* populaatiossa, että heterogeenisessä *E. coli* ja *B. subtilis* sisältävässä populaatiossa. Plasmidin inhiboivaa vaikutusta *E.coli* kasvuun ei ole havaittu. GeneGuardit ovat kokoelma bioturvallisia plasmideja, joita voidaan käyttää vektorina useimmissa *E.coli* isäntäsoluna käyttävissä projekteissa. GeneGuard- plasmidia voidaan käyttää vektorina normaalien tapaan geenien siirrossa synteettisen biologian sovelluksissa tai GeneGuard systeemi voidaan integroida osaksi käytettävää plasmidia. (Wright et al. 2015)

## 4. JOHTOPÄÄTÖKSET

Geenimuokattujen organismien geneettiseen eristämisen on onnistuttu kehittämään erilaisia menetelmiä. Synteettisen biologian alan kasvaessa kehittyi uusia sovelluskohteita muokatuille organismeille ja niiden käyttö avoimissa systeemeissä lisääntyy. Huoli transgeenien ja muokattujen organismien leviämisestä luontoon on vauhdittanut tutkimusta uusille, tehokkaimmille menetelmille geneettiseen eristämiseen. Taulukkoon 1 on koottu yhteenveto tämänhetkisiä geneettisen eristämisen menetelmiä, niiden käyttökohteista sekä ominaisuuksia.

*Taulukko 1. Yhteenveto geneettisen eristämisen menetelmistä.*

Menetelmä	Sovelluskohde	Vahvuudet	Heikkoudet
<b>GURT</b>	Kasvit	Estää hyvin kasvin leviämisen	Ei sovellu käytettäväksi itsestään lisääntyvissä organismeissa
<b>Geneettinen erottaminen</b>	Virukset	Toimii hyvin käyttökohteessaan, itseinaktivoivat vektorit	Ei sovellu käytettäväksi itsestään replikoituissa organismeissa, virukset alun perin patogeenisiä
<b>Auksotrofia</b>	Mikrobit	Edullinen, yksinkertainen	Horisontaalinen geenisiirto
<b>Tappokatkaisimet</b>	Mikrobit	Tehokas	Mekanismi voi hajota
<b>Xenobiologia</b>	Mikrobit	Täydellinen geneettinen muuri	Vaatii paljon muokkausta, ei skaalattava
<b>GeneGuard</b>	<i>E. coli</i>	Estää sekä transgeenien, että organismin leviämisen	Soveltuu tällä hetkellä vain <i>E.colia</i> käyttäviin sovelluksiin

Perinteinen auksotrofia ei ole yhtä tehokas tahattoman leviämisen estämisen keino, kuin synteettisistä ravinteista riippuvainen auksotrofi. Luonnon yhdisteistä riippuvainen auksotrofi voi löytää tarvitsemaansa yhdistettä luonnosta toisen organismin tuottamana. Kaikki kannat eivät ole mukautuvia synteettiseen auksotrofiaan. Auksotrofit organismit soveltuvat huonosti käytettäväksi bioreaktoreissa ja biopuhdistuksessa, koska auksotrofia inhiboi kasvua, vaikka tarvittavaa metaboliittia olisi saatavilla. Vaikka auksotrofian avulla onnistuttaisiinkin tappamaan muokattu organismi ympäristössä, horisontaalinen

geenisiiro on kuitenkin mahdollista vielä organismin kuoltuakin. Antibioottiresistenssigeenin ollessa yleinen käytetty selektiomarkkeri muokatuissa organismeissa tämä luo mahdollisuuden geenin leviämislle luontoon ja lääkkeille vastustuskykyisempien patogeenien muodostumiselle.

Biologisten tappokatkaisimien yhdistäminen toksiini-antitoksiini-systeemiin on tehokas menetelmä estää organismin lisääntyminen luonnon ympäristössä. Lisäksi systeemissä muokattu geneettinen materiaali on sellaisessa muodossa, että sen integroiminen toiseen kantaan ei ole kannattavaa. Heikkoutena tappokatkaisimissa on kuitenkin DNA:n poistojen vaikutus sekä transposonien ilmestyminen, jotka voivat hajottaa suojaimekanismin.

Xenobiologia voi luoda geneettisen muurin luonnonkantojen ja synteettistä XNA:ta kantavien kantojen välille. Xenobiologiset organismit ovat riippuvaisia synteettisistä yhdisteistä ja näitä ei löydy luonnosta. Xenobiologiset organismit ovat tehokkain aukuotrofian keino, ja niissä etuna on myös se, että niiden geneettisen informaation lukeminen ei onnistu luonnonkannoilta. Vaaraa siis transgeenien leviämisestä ei ole. Xenobiologisten organismien luominen vaatii kuitenkin paljon geneettistä muokkaamista, mikä vaikeuttaa menetelmän skaalautuvuutta.

Biologisten tappokatkaisimien yhdistäminen toksiini-antitoksiini-systeemiin on tehokas menetelmä estää organismin lisääntyminen luonnon ympäristössä. Lisäksi tällaisessa systeemissä muokattu geneettinen materiaali on sellaisessa muodossa, että sen integroiminen toiseen kantaan ei ole kannattavaa. Heikkoutena tappokatkaisimissa on kuitenkin DNA:n poistojen vaikutus sekä transposonien ilmestyminen, jotka voivat hajottaa suojaimekanismin. Kasvien ja virusten geneettiseen eristämiseen kehitetyt ratkaisut soveltuvat käyttökohteisiinsa hyvin, muuta samoja tekniikoita ei voida soveltaa itsenäisesti replikoituissa organismeissa, kuten bakteereissa. Bakteerit ovat edullisuutensa vuoksi isäntäsoluja useimmissa bioteknisissä sovelluksissa.

Ennen kuin täysin varmoja geneettisen eristämisen mekanismeja on suunniteltu, tulee geneettisesti muokattujen organismien käsittely tehdä huolellisesti ja vastuullisesti. Geneettiseen eristämiseen voidaan vaikuttaa sekä käytettyjen organismien muokkauksella, mutta myös prosessin suunnittelulla. Fyysinen hallinta on varmin tapa estää organismien pääsy luontoon. Vahingollisen vapautumisen sattuessa suojaimekanismit kuitenkin pienentävät riskiä, että geneettisesti muokatut organismit selviävät luonnossa.

Mikä tahansa tekninen ratkaisu, jolla pyritään eristämään geneettistä materiaalia voi pettää, koska kyseessä on elävät organismit ja niiden toimintaa ei voida täysin ennustaa.

Myös ihmiselementin ollessa mukana synteettisen biologian sovelluksissa vuotoja luontoon voi tapahtua, vaikka muokattujen organismien hävittämiseen laboratorio-olosuhteissa ja teollisuudessa olisikin hyvät käytännöt. Näissä tapauksissa tekniset ratkaisut auttavat muokattujen organismien leviämisen sekä geneettisen materiaalin leviämisen estämisessä.

Monitasoiset ja erilaisia ratkaisuja yhdistävät ratkaisut tekevät synteettisen biologian systeemistä turvallisemman ja turvamekanismista tehokkaamman. Geneettisen eristämisen ratkaisun tulisi olla sellainen, että sekä vertikaalinen, että horisontaalinen geenisiirto on estetty. Turvallisuusmekanismin tulisi siis olla sellainen, että organismi ei selviä ympäristössä, johon sitä ei ole tarkoitettu ja lisäksi sen sisältämän geneettisen materiaalin tulisi olla sellaista, ettei sen integroiminen luonnonkantaan ole vastaanottajalle kannattavaa. GeneGuard on hyvä esimerkki monitasoisesta geneettisen eristämisen ratkaisusta. Se tarjoaa isäntäsoluriippuvaisia plasmideja synteettisen biologian käyttöön eikä sen inhiboivia vaikutuksia ole havaittu. Toistaiseksi GeneGuard plasmidit soveltuvat vain *E.colia* isäntäsoluna käytäviin sovelluksiin.

Tulevaisuudessa biologian teknologiat ovat halvempia ja tehokkaampia, joka mahdollistaa kokonaisten biologisten systeemien luomisen pelkkien yksittäisten geenien muokauksen sijaan. Systemaattisella ja modulaarisella organismien suunnittelulla voidaan luoda turvallisia synteettisiä organismeja, joiden toiminnot ovat tiedossa. Synteettisen biologian yleistyessä ihmisten huoli vaaroista tulee kannustamaan tieteellistä yhteisöä pyrkimään keksimään uusia tapoja muokattujen organismien turvallisuuden lisäämiseksi. Tällä hetkellä suojamekanismeille ei ole teknisiä suosituksia turvallisen vapautusmäärän lisäksi. Suositukset suojamekanismeissa oleville ominaisuuksille toisivat geenimuokattujen organismien hallintaan parempaa ohjeistusta seurattavaksi, ja se käynnistäisi varmasti myös enemmän tutkimusta tälle puolelle synteettistä biologiaa.

## LÄHTEET

Anderson, J., Strelkowa, N., Stan, G., Douglas, T., Savulescu, J., Barahona, M. & Papachristodoulou, A. (2012). Engineering and ethical perspectives in synthetic biology, *EMBO reports*, Vol. 13, pp. 584—590.

Clement TY Chan, Jeong Wook Lee, D Ewen Cameron, Caleb J Bashor & James J Collins (2016). 'Deadman' and 'Passcode' microbial kill switches for bacterial containment, *Nature Chemical Biology*, Vol. 12, pp. 82—86.

Dana, G.V., Kuiken, T., Rejeski, D. & Snow, A.A. (2012). Four steps to avoid a synthetic-biology disaster, *Nature*, Vol. 483, pp. 29.

Gallagher, R.R., Patel, J.R., Interiano, A.L., Rovner, A.J. & Isaacs, F.J. (2015). Multilayered genetic safeguards limit growth of microorganisms to defined environments, *Nucleic Acids Research*, Vol. 43, pp. 1945—1954.

Gronvall, G. (2018). Safety, security, and serving the public interest in synthetic biology, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 45, pp. 463—466.

Haynes, K.A. (2016). Synthetic biology: Building genetic containment, *Nature Chemical Biology*, Vol. 12, pp. 55—56.

Hills, M.J., Hall, L., Arnison, P.G. & Good, A.G. (2007). Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement, *Trends in Plant Science*, Vol. 12, pp. 177—183.

Hong-Geller, E. & Micheva-Viteva, S. (2015). Targeting Bacterial Persistence to Develop Therapeutics Against Infectious Disease

Lee, J.W., Chan, C.T.Y., Slomovic, S. & Collins, J.J. (2018). Next-generation biocontainment systems for engineered organisms, *Nature Chemical Biology*, Vol. 14, pp. 530—537.

Lombardo, L. (2014). Genetic use restriction technologies: a review, *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 12, pp. 995—1005.

Moe-Behrens, G.H.G., Davis, R. & Haynes, K.A. (2013). Preparing synthetic biology for the world, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 4

Prakash, D., Verma, S., Bhatia, R. & Tiwary, B.N. (2011) Risks and Precautions of Genetically Modified Organisms, *Hindawi*.

Schmidt, M. (2010). Xenobiology: A new form of life as the ultimate biosafety tool, *BioEssays*, Vol. 32, pp. 322—331.

Serrano, L. (2007). Synthetic biology: promises and challenges, *Molecular Systems Biology*, Vol. 3, pp. 158.

Simon, A.J. & Ellington, A.D. (2016). Recent advances in synthetic biosafety, *F1000 Research*, Vol. 5 pp. 2118.

Whitford, C.M., Dymek, S., Kerkhoff, D., März, C., Schmidt, O., Edich, M., Droste, J., Pucker, B., Rückert, C. & Kalinowski, J. (2018). Auxotrophy to Xeno-DNA: an exploration of combinatorial



mechanisms for a high-fidelity biosafety system for synthetic biology applications, *Journal of biological engineering*, Vol. 12, pp. 13—28.

Wright, O., Delmans, M., Stan, G. & Ellis, T. (2015). GeneGuard: A Modular Plasmid System Designed for Biosafety, *ACS synthetic biology*, Vol. 4, pp. 307—316.

Wright, O., Stan, G. & Ellis, T. (2013). Building-in biosafety for synthetic biology, *Microbiology*, Vol. 159, pp. 1221—1235.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. & Trono, D. (1998). Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery, *Journal of Virology*, Vol. 72, pp. 9873—9880.